

DELPHION



RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

My Account

Help

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: PDF | More choices...

View: Jump to: Top Go to: Derwent

Tools: Add to Work File: Create new Work File Add!

© Title: CN1355319A: PROCESS FOR SEPARATING NUCLEIC ACID FROM BIOLOGICAL PARTICLES BY SOLID-PHASE CARRIER

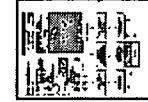
Derwent Title:

CN China

A Unexamined APPLIC. open to Public inspection !

High Resolution

Resolution



Country:

China

Kind:

A

Inventor:

XU ZHANG; China

XIN XIE; China

JIMING CHEN; China

Assignee:

QINGHUA UNIV China

News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed:

2002-06-26 / 2001-12-07

Application Number:

CN2001000140445

IPC Code:

C12P 19/34; C07H 21/00;

ECLA Code:

None

Priority Number:

2001-12-07 CN2001000140445

Abstract:

A process for using solid-phase carrier to separate nucleic acid from biologic particles features that the nm-class magnetic microspheres emulsion or the specially treated fibrous membrane is used assolid-phase adsorbing medium to separate cell from biologic particle, the cell-cracking liquid is used to crack cell structure, the solid-phase adsorption and desorption are used to directly collect the biologic particles rich in nucleic acid from biologic specimen such as blood plasma, etc., and the nucleic acid is extracted. Its

BEST AVAILABLE COPY



advantages include simple process, high speed, and easy automation and miniaturization.

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1355319A	2002-06-26	2001-12-07	PROCESS FOR SEPARATING NUCLEIC ACID FROM BIOLOGICAL PARTICLES BY SOLID-PHASE CARRIER

1 family members shown above

CHEMABS 138(13)182002A DERABS C2003-403874

Other Abstract Info:



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation
Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact Us | Help

BEST AVAILABLE COPY

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 19/34

C07H 21/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01140445.0

[43] 公开日 2002 年 6 月 26 日

[11] 公开号 CN 1355319A

[22] 申请日 2001.12.7 [21] 申请号 01140445.0

[71] 申请人 清华大学

地址 100084 北京市 100084 - 82 信箱

共同申请人 北京博奥生物芯片有限责任公司

[72] 发明人 张 旭 谢 欣 陈继明

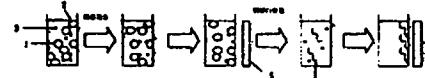
陈德朴 费维扬 程 京

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 1 页

[54] 发明名称 利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法

[57] 摘要

利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法属于生物粒子快速分离技术领域，其特征在于：它用纳米磁性微球悬浮液或经特别处理的纤维膜作固相吸附介质来分离生物粒子中的细胞，再用细胞裂解液裂解细胞结构，通过固相吸附和解吸附以便直接从全血、血浆、唾液、尿液、细胞和组织培养液等生物样品中富集含有核酸的白细胞、病毒粒子、上皮细胞、培养细胞等的生物粒子，并获取核酸。这种方法简便快速，可用于各种不同规模和品种的样品制备，而且易于实现自动化、微型化装置的构建。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，依次包含分离并裂解生物粒子的细胞结构并从中分离出核酸的步骤，其特征在于，它依次含有以下步骤：
 - (1) 在生物样品中加入可物理吸附含有核酸的细胞的固相吸附介质，它是一种悬浮状的粒径范围为 5~10000nm 且经有机包覆的纳米磁性微球，使它们旋转混匀后静置；
 - (2) 分离出上述固相吸附介质，弃去上清液，用缓冲液洗涤；
 - (3) 加入细胞裂解液使其和固相吸附介质旋转混匀并静置后结合缓冲液使细胞裂解；
 - (4) 用洗脱缓冲液洗涤上述固相吸附介质，获得上述固相吸附介质——核酸的复合物；
 - (5) 回收含有核酸的洗脱缓冲液并分离出核酸。
2. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的第(4)步获得的复合物是一种“微珠—聚合酶链式反应（PCR）”技术中的目标基因扩增用的模板。
3. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：对于小分子核酸（RNA 或质粒子 DNA）而言，在第(3)步中，可在弃去的上清液中再加入固相吸附介质，根据需要用 DNA 裂解酶或 RNA 酶去消化不需要的小分子核酸后，再按步骤(4)、(5)依次进行。
4. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的固相吸附材料是在室温下用 0.3mol/l NaOH 液浸泡过夜，然后再用 0.5mol/l BC1₃ · 2H₂O 浸泡 8 小时经去离子水洗至 PH 值为中性的玻璃纤维膜。
5. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的分离固相吸附介质和液体的方法是磁场分离法。
6. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的细胞裂解液含有：2.5~4 mol/l NaI，3~5 mol/l 尿素，30~50g/l Triton-100 (三硝基甲苯)，8~12mmol/l EDTA (乙二胺四乙酸钠) (pH6.5)，15~30mmol/l Tris · HCl (三羟甲基氨基甲烷) (pH6.5)。
7. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的细胞裂解液组成为：15~20g GuSCN (异硫氰酸胍)，pH6.0 的 100ml TE (10mmol/l EDTA，25m mol/l Tris · HCl)，15~30g PEG8000 (聚乙二醇)。
8. 根据权利要求 1 的利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法，其特征在于：所述的洗脱缓冲液是 TE 溶液 (10mmol/l Tris · HCl，1mmol/l EDTA)。

说 明 书

利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法

技术领域

一种利用固相载体从生物粒子中分离核酸的方法属于快速分离并裂解生物粒子的细胞以获取核酸的技术领域。

背景技术

以生物芯片为基础，在微阵列的技术平台上集成了样品处理，生物反应及结果检测的“微型生物芯片实验室”是生物芯片技术的高级形式，目前对生化反应和结果检测装置的芯片构建已取得较大进展，但如何在芯片上构建自动化的样品制备装置仍然是一个难题。这是因为：从全血，血浆，唾液，尿液，细胞和组织培养液等生物样品中富集含有核酸，蛋白等目标分子的白细胞、病毒粒子、上皮细胞、培养细胞等生物粒子，再在细胞裂解液作用下裂解细胞，通过萃取沉淀的方法才能获得目标分子，其中要经过分离生物粒子，裂解细胞结构和分离目标分子共三个步骤。要想实现样品分离自动化和微型化的目标，操作方案必须同时满足以下要求：（1）样品和所用试剂的体积必须尽可能小，（2）尽量回避离心操作，（3）操作步骤尽可能少，（4）操作过程尽量避免引入污染，（5）分离方法有一定普遍适用性，但现有的制样方法难以达到这些要求，如传统的从全血中分离核酸的方法是苯酚—氯仿法，要使用离心分离法和有毒试剂。已有方法由于没有很好地解决细胞分离问题，大多需用离心操作；在核酸洗脱过程中有的还需升温，也制约了其全过程自动化。在分离高分子 DNA 时样品往往需要前处理，因而步骤多，难以实现微型化。

发明内容

本发明的目的在于提供一种利用固相载体从生物样品中快速分离生物粒子，用细胞裂解液裂解细胞结构，用洗脱缓冲液分离核酸或者利用微珠—聚合酶链式反应（PCR）技术进行目标基因扩增，把扩增产物存于液相之中的提取分离核酸的方法。

本发明的特征在于，它依次含有以下步骤：

- (1) 在生物样品中加入可物理吸附含有核酸的细胞的固相吸附介质，它是一种悬浮状的粒径范围为 5~10000nm 且经有机包覆的纳米磁性微球，使它们旋转混匀后静置；
- (2) 分离出上述固相吸附介质，弃去上清液，用缓冲液洗涤；
- (3) 加入细胞裂解液使其和固相吸附介质旋转混匀并静置后结合缓冲液使细胞裂解；
- (4) 用洗脱缓冲液洗涤上述固相吸附介质，获得上述固相吸附介质——核酸的复合物；
- (5) 回收含有核酸的洗脱缓冲液并分离出核酸。

所述的第(4)步获得的复合物是一种“微珠—聚合酶链式反应（PCR）”技术中的目标基因扩增用的模板。

对于小分子核酸（RNA 或质粒子 DNA）而言，在第（3）步中，可在弃去的上清液中再加入固相吸附介质，根据需要用 DNA 裂解酶或 RNA 酶去消化不需要的小分子核酸后，再按步骤（4）、（5）依次进行。

所述的固相吸附材料是在室温下用 0.3mol/l NaOH 液浸泡过夜，然后再用 0.5mol/l BC1₃·2H₂O 浸泡 8 小时经去离子水洗至 PH 值为中性的玻璃纤维膜。

所述的分离固相吸附介质和液体的方法是磁场分离法。

所述的细胞裂解液含有：2.5~4 mol/l NaI，3~5 mol/l 尿素，30~50g/l Triton—100（三硝基甲苯），8~12mmol/l EDTA（乙二胺四乙酸钠）（pH6.5），15~30mmol/l Tris·HCl（三羟甲基氨基甲烷）（pH6.5）。

所述的细胞裂解液组成为：15~20g GuSCN（异硫氰酸胍），pH6.0 的 100ml TE（10mmol/l EDTA，25m mol/l Tris·HCl），15~30g PEG8000（聚乙二醇）。

所述的洗脱缓冲液是 TE 溶液（10mmol/l Tris·HCl，1mmol/l EDTA）。

使用证明：它达到了预期目的。

附图说明

图 1：实施例 3 的人类基因组 DNA 电泳图谱。从 300 μl 人全血中用 15mg/ml 磁球悬浮液提取的基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测图。磁球悬浮液的量：1（图 2 中的标号，下同）和 2, 5 μl; 3 和 4, 10 μl; 5 和 6, 20 μl; 7 和 8, 30 μl; 9 和 10, 50 μl; 11 和 12, 70 μl; 13, 100 μl; 14, 120 μl; 15, 150 μl; M: 1 μl λ phage DNA (Hind III 酶切) marker.

图 2：从人全血中用磁球提取的基因组 DNA 进行 HLA-A 等位基因 PCR 扩增后产物的琼脂糖电泳检测图。O：阴性对照，P：阳性对照。

图 3：用磁性微球从全血中分离 DNA 的流程示意图。

具体实施方法

实施例 1：高分子 DNA 的分离。以用纳米磁性微球吸附 DNA 片断为例：在高温消毒的小离心管（eppendorf）中加入 15mg/ml 的纳米磁性微球悬浮液 40 μl 以及 0.4 μg/μl 的双链入-DNA 分子量标记（marker）（Hind III 酶切）15 μl，在旋涡振荡器上轻微振荡 15s，再加入 4mol·L⁻¹ 的 NaI 溶液 80 μl，轻微振荡 15s 后，静置 3 分钟。再加入助吸剂异丙醇 100 μl，轻微振荡 5s，后静置 2 分钟。用磁性分离架把磁球固定，弃去上清液，用 100 μl、70% 的乙醇洗涤已吸附 DNA 的纳米磁球 2 次。加入 50 μl、pH=8.0 的 TE 溶液（10mol·L⁻¹ Tris·Cl，1mmol·L⁻¹ EDTA）。在水浴中 62℃ 恒温 12 分钟把 DNA 从磁球上洗脱下来。再把磁球与 TE 溶液分离，把得到的 TE 溶液用琼脂糖水平凝胶电泳检测分离的 DNA 片断。全部操作只需 15min，DNA 片断回收率为 95% 以上。

实施例 2：用纳米磁性微球分离大肠杆菌的基因组的（genomic）DNA。

样品为培养过夜的不含质粒的 *E. Coli* 大肠杆菌菌株。取收获的细胞培养液 300 μl，再

加入 50 μ l 纳米磁性微球悬浮液。振荡混合后采用磁性分离架分离磁球，弃去上清液。向磁球加入 300 μ l 细胞裂解液 (3 mol/l NaI, 4 mol/l 尿素, 30g/l Triton-X-100 (三硝基甲苯), 10 mmol/l EDTA (pH 6.5), 25 mmol/l Tris·HCl (pH 6.5)) (下同)，摇匀，室温静置 5min。加入 300 μ l 异丙醇。在旋涡振荡器上轻微振荡 15s，室温静置 5min。用磁性分离架把磁球固定，弃上清后，再用 70% 乙醇洗磁性微球 2 次。然后加上述 100 μ l TE 溶液 (pH=6.0)，室温静置 10min。再用磁性分离架把磁球固定，收集洗脱液，进行紫外分析和琼脂糖凝胶电泳。DNA 产量约为 30 μ g/ml，与传统的十二烷基硫酸钠 (SDS) 加蛋白酶 K 破胞，酚一氯仿抽提法相比，产量及纯度相当。

实施例 3：用纳米磁性微球吸附分离全血中白细胞并提取其中 DNA。

本试验所用全血由健康供血者提供，用血液 1/6 体积的 ACD (23 mmol/l 柠檬酸, 80 mmol/l 葡萄糖, 45 mmol/l 柠檬酸钠) 抗凝。取适量的血液 300 μ l，加入 50 μ l 上述磁性微球溶液 (用上述 pH=6.0 的 TE 溶液悬浮)，在旋涡振荡器上轻微振荡 15s，室温静置 3min 后，用磁性分离架把磁球固定。弃其他部分。加入 300 μ l 细胞裂解液，振荡混匀，室温静置 2min。再加入 300 μ l 异丙醇振荡混匀，室温静置 5min。用磁性分离架把磁球固定，弃上清液。用 70% 乙醇洗涤 2 次磁球后，加入上述 pH 6.0 的 TE 溶液，10min 后用磁性分离架把磁球固定，收集洗脱液，进行凝胶电泳分析，紫外分光分析。提取的基因组 DNA 用琼脂糖凝胶 (0.9%) 电泳检测，电泳图谱见附图 1。该方法建立了一种快速高效的从全血中制备基因组 DNA 的方法，它不用有毒试剂，操作安全。分别用在上述操作中所获的含人类基因组 DNA 的洗脱液或所获的吸附有基因组 DNA 的磁珠直接作模板进行公知的 HLA-A (人类白细胞抗原) 等位基因的 PCR 试验，扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测。电泳图谱见附图 2。本试验建立了一种快速高效的 HLA 等位基因扩增的磁珠-PCR 法 (microsphere based PCR)，与传统制样方法相比更为简单，快速，模板制备仅需 10min，并且排除了 PCR 抑制剂，且无非特异性扩增。图 3 是本发明的磁性分离法的流程示意图。1 是白细胞，2 是红细胞，3 是磁球，4 是 DNA，5 是磁铁。先使磁球 3 和生物样品人全血轻微振荡再静置，磁球 3 吸附白细胞 1 后被磁铁 5 吸附在管壁，弃去其余溶液。加入细胞裂解液后进入裂解白细胞结构的过程，破胞后，DNA 4 被磁球 3 吸附后，在磁铁 5 作用下吸附在管壁上，弃去其余溶液，用 TE 洗脱缓冲液把 DNA 从磁球上洗下后，将磁球通过磁铁 5 固定，将含 DNA 的 TE 溶液移至新管中。对 300 μ l 人全血，采用 100 μ l 磁球溶液 (15 μ g/ μ l) 可得到结果。

实施例 4：用纳米磁性微球分离大肠杆菌的质粒 DNA。

样品为培育过夜的含质粒的 *E. coli* 菌株，试验步骤为：取收获的细胞培养液 300 μ l，然后加入 50 μ l 纳米磁性微球悬浮液 (15 μ g/ μ l)，振荡混合后采用磁性分离架分离磁球，弃溶液，向磁球加入 300 μ l 细胞裂解液，摇匀，室温静置 5min，再加入 300 μ l 异丙醇振荡混匀，室温静置 5min。用磁性分离架把磁球固定，转移上清液至另一新管中，重新加入 50 μ l 纳米磁

性微球悬浮液及 $300\mu l$ 异丙醇，摇匀，室温静置 5min，用磁性分离架把磁球固定，弃上清，再用 70% 乙醇洗涤磁球 2 次。然后加入上述 pH6.0 的 TE 溶液 $100\mu l$ ，和适量 RNA 酶溶液，在适宜温度下降解 RNA。再用磁性分离架将磁球固定，收集洗脱液，进行紫外分析和琼脂糖电泳检测。质粒 DNA 产量约为 $5\mu g/ml$ ，与传统的方法相比，产量及纯度相当。如果要用纳米磁性微球分离大肠杆菌的 RNA，则可用 DNA 酶来代替上述的 RNA 酶，其余步骤相同。

实施例 5：用经过处理的纤维膜吸附 DNA 片断。

在高温消毒的 eppendorf 管中加入剪成直径 0.5 厘米圆形膜片的处理后的玻璃纤维膜，再在纤维膜上加入 $0.4mg/\mu l$ 的双链 λ -DNAmarker (Hind III 酶切) $15\mu l$ ，又加入 $5mol \cdot L^{-1}$ NaI 溶液 $80\mu l$ ，轻微振荡 15s，然后静置 1min。再加入助吸附剂异丙醇 $100\mu l$ ，轻微振荡 5s，静置 2min。用离心法除去上清液。用 $100\mu l$ 、70% 的乙醇洗涤吸附 DNA 的膜片 2 次。加入 $50\mu l$ TE 溶液 ($pH=8.0$, $10mmol \cdot L^{-1}$ Tris. Cl, $1mmol \cdot L^{-1}$ EDTA)。在水浴中用 $62^{\circ}C$ 恒温 12min，把 DNA 从膜片洗脱下来。然后用离心法把膜片与 TE 溶液分离，把得到的 TE 溶液用琼脂糖水平凝胶电泳检测分离的 DNA 片断。整个操作只需 15min。

实施例 6：用经过处理的纤维膜分离大肠杆菌的基因组 DNA。

样品为培养过夜的不含质粒的 *E.Coli* 菌株。取收获的细胞培养液 $300\mu l$ ，然后加入剪成宽 0.3 厘米的处理过的条状纤维膜膜片。振荡混匀后用吸管吸取再弃去上清液。加入 $300\mu l$ 细胞裂解液 ($20gGuSCN$, $100ml$ TE ($pH6.0$) ($10mmol \cdot L^{-1}$ Tris. Cl, $25mmol \cdot L^{-1}$ EDTA), $20gPEG8000$)，摇匀，室温静置 5min。加入 $300\mu l$ 70% 乙醇，在旋涡振荡器上轻微振荡 15s，室温静置 5min。用吸管吸取后再弃去上清液，再用 70% 乙醇洗膜片 2 次。然后加 $pH=6.0$ 的上述 $100\mu l$ TE 溶液，室温静置 10min。收集洗脱液，进行紫外分析和琼脂糖凝胶电泳。DNA 产量约为 $40\mu g/ml$ ，与传统的 SDS 加蛋白酶 K 破胞，酚一氯仿抽提法相比，产量及纯度相当。

01.12.01

说 明 书 附 图

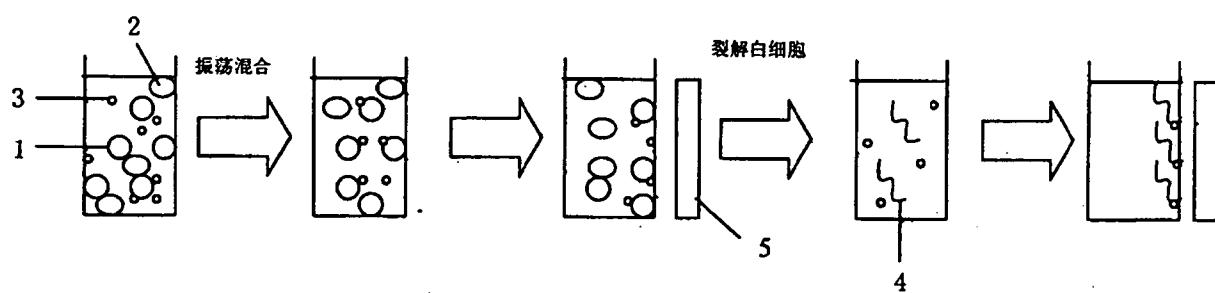
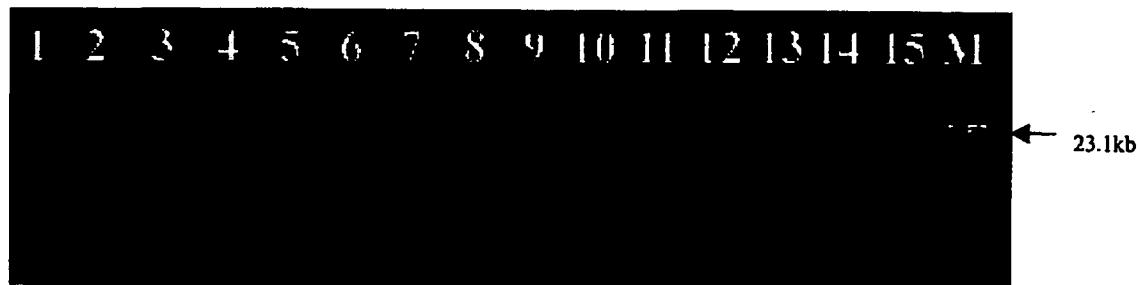


图 3